

22.09.2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

REC'D 11 NOV 2004

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 9 月 2 6 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 3 3 6 1 9 9
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 3 3 6 1 9 9]

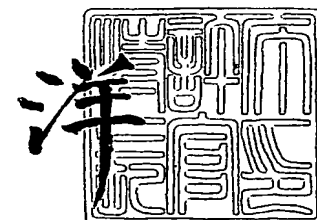
出 願 人 松 下 電 器 産 業 株 式 会 社
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 0 月 2 9 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願
【整理番号】 2033750140
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 G01N 33/536
G01N 33/53
G01N 33/577

【発明者】
【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地 松下電器産業株式会社内
【氏名】 北脇 文久

【発明者】
【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地 松下電器産業株式会社内
【氏名】 亀井 明仁

【発明者】
【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地 松下電器産業株式会社内
【氏名】 河村 達朗

【特許出願人】
【識別番号】 000005821
【氏名又は名称】 松下電器産業株式会社

【代理人】
【識別番号】 100098291
【弁理士】
【氏名又は名称】 小笠原 史朗

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 035367
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 9405386

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

検体中の被検物質を抗原抗体反応原理に基づいて測定する方法であって、
前記被検物質に対する抗体を含む試薬と前記検体を混合する工程、
前記混合の結果生じる反応系において、前記被検物質と前記抗体との間で形成される抗原抗体複合体の量を測定する工程、および
前記抗原抗体複合体の量を測定する工程において測定された前記抗原抗体複合体の量に基づいて前記被検物質の量を算出する工程を含み、
ここで、前記抗体の pI と前記反応系の pH との関係が、 $pI > pH$ となるように設定されている、測定方法。

【請求項 2】

前記 pI と前記 pH との差が、約 0.5 以上である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 pI と前記 pH との差が、約 1.0 以上である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記反応系の pH が酸性に設定されている、請求項 1～3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

前記 pH が約 4～約 6 の範囲である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記 pH が約 4.5 である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記混合する工程は、緩衝液に前記試薬を添加する工程と、前記試薬を含む前記緩衝液と前記検体とを混合する工程とを含む、請求項 1～6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

前記緩衝液の pH が、前記抗体の pI に対して、 $pI > pH$ となるように調整されている、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記反応系が、有機酸または有機酸塩を含有する、請求項 1～8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

前記有機酸または有機酸塩が、多価カルボン酸または多価カルボン酸塩である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記多価カルボン酸または多価カルボン酸塩が、トリカルボン酸またはトリカルボン酸塩である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記抗体が、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、または標識抗体である、請求項 1～11 のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】

前記測定する工程は、前記複合体の量もしくは大きさの変化に起因する光学変化量を測定することを含む、請求項 1～12 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

抗原抗体反応原理に基づいて検体中の被検物質を測定するための試験溶液であって、前記被検物質に対する抗体を含有し、当該抗体の pI に対して、 $pI > pH$ となるように pH が調整されている、試験溶液。

【請求項 15】

前記 pI と前記 pH との差が、約 0.5 以上である、請求項 14 に記載の試験溶液。

【請求項 16】

前記 pI と前記 pH との差が、約 1.0 以上である、請求項 14 に記載の試験溶液。

【請求項 17】

酸性 pH を有する、請求項 14～16 のいずれかに記載の試験溶液。

【請求項 18】

pH が約 4～約 6 の範囲にある、請求項 17 に記載の試験溶液。

【請求項 19】

pH が約 4.5 である、請求項 18 に記載の試験溶液。

【請求項 20】

有機酸または有機酸塩を含有する、請求項 14～19 のいずれかに記載の試験溶液。

【請求項 21】

前記有機酸または有機酸塩が、多価カルボン酸または多価カルボン酸塩である、請求項 20 に記載の試験溶液。

【請求項 22】

前記多価カルボン酸または多価カルボン酸塩が、トリカルボン酸またはトリカルボン酸塩である、請求項 21 に記載の試験溶液。

【請求項 23】

前記抗体が、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、または標識抗体である、請求項 14～22 のいずれかに記載の試験溶液。

【請求項 24】

検体中の被検物質を抗原抗体反応原理に基づいて測定するためのキットであって、
少なくとも緩衝液と
被検物質に対する抗体を含む試薬を含み、
前記緩衝液の pH と前記抗体の pI とが、 $pH < pI$ の関係を有するように構成されている、測定用キット。

【請求項 25】

前記 pI と前記 pH との差が、約 0.5 以上である、請求項 24 に記載のキット。

【請求項 26】

前記 pI と前記 pH との差が、約 1.0 以上である、請求項 24 に記載のキット。

【請求項 27】

前記緩衝液の pH が、酸性である、請求項 24～26 のいずれかに記載のキット。

【請求項 28】

前記緩衝液の pH が、約 4～約 6 の範囲にある、請求項 27 に記載のキット。

【請求項 29】

前記緩衝液の pH が、約 4.5 である、請求項 28 に記載のキット。

【請求項 30】

前記緩衝液が、有機酸または有機酸塩を含む、請求項 24～29 のいずれかに記載のキット。

【請求項 31】

前記有機酸または有機酸塩が、多価カルボン酸または多価カルボン酸塩である、請求項 30 に記載のキット。

【請求項 32】

前記多価カルボン酸または前記多価カルボン酸塩が、トリカルボン酸またはトリカルボン酸塩である、請求項 31 に記載のキット。

【請求項 33】

前記抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、または標識抗体である、請求項 24～32 のいずれかに記載のキット。

【請求項 34】

前記抗体は、異なるエピトープを認識する少なくとも 2 種類以上のモノクローナル抗体の混合物である、請求項 33 に記載のキット。

【請求項 35】

前記抗体試薬は、乾燥状態で提供される、請求項 24～34 のいずれかに記載のキット。

。

【請求項 36】

前記緩衝液と前記抗体とが、前記被検物質の測定のために使用される直前に混合されて試験溶液として使用される、請求項 24～35 のいずれかに記載のキット。

【請求項 37】

前記抗体は、物質がもつ電荷の差を利用する分析法または精製法により調製される、請求項 24～36 のいずれかに記載のキット。

【請求項 38】

前記物質がもつ電荷の差を利用する分析法または精製法は、等電点沈降法、等電点電気泳動、イオン交換クロマトグラフィ法、または等電点クロマトグラフィ法のいずれかである、請求項 37 記載のキット。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 免疫反応測定方法及びそれに用いる試験溶液、測定用反応キット

【技術分野】

【0001】

本発明は、検体中に含まれる被検物質を測定することができる免疫反応測定方法及びそれに用いる試験溶液、測定用反応キットに関する。

【背景技術】

【0002】

医療、臨床検査の分野においては、様々な疾患の診断及び病状の経過を調べるために、ヒトの体液中に存在する各疾患に特徴的なタンパク質を調べることが広く行われている。例えば、リウマチ熱の要因となる溶連菌に個体が感染すると、血液中にそれに抵抗するためのASOという抗体が産生される。したがって、血液中のこの抗体の量を測定項目として試験することによって、その個体が溶連菌に感染しているかどうかを調べることができる。あるいは、例えば、RA（慢性関節リウマチ）患者の血清中には、RF（リウマチ因子）が高頻度に出現することが知られている。RA患者の血清中IgG糖鎖は、健常者IgG糖鎖と比較して、ガラクトースを顕著に欠損し糖鎖異常を起こしている。RA発症初期からガラクトース欠損IgGが産生され、これに対する自己抗体が関節炎などの発症に関与していると考えられている。そこで、ガラクトース欠損IgG抗原を使用して血清中の抗ガラクトース欠損IgG抗体を測定項目として試験することにより、RAの診断が可能となる。

【0003】

これらのタンパク質の含有量測定には、主として、特異性の高い免疫反応測定方法が広く用いられている。それらの中でも、免疫比ろう法（もしくは、免疫比濁法）は、抗原と抗体の特異的な反応により生じる凝集複合体を検出する方法であり、基本的に均一溶液中で行われるため、定量性の良い方法である。さらに、抗原抗体複合体と未反応の抗体及び抗原を分離することなく測定できる方法であるため、操作が容易である。

【0004】

一方、免疫比ろう法による測定では、一般に、抗原過剰領域において、プロゾーン現象が発生する。そのため、測定項目によっては、必要とされる測定濃度領域で正確な測定ができないという問題があった。「プロゾーン現象」は、「地帯現象」とも呼ばれ、抗原と抗体が最大の凝集複合体を形成する当量域よりも、いずれかが過剰に存在する場合に、凝集複合体が生じにくくなり、測定値（例えば、散乱光強度）が本来の値よりも小さくなる現象である。

【0005】

実際の均一系の免疫反応測定では、抗体を用いて被検物質としての抗原の濃度を測定する場合が多い。一般に、プロゾーン現象の起こっていない抗原濃度領域では、抗体と抗原が交互に結合した複合体からなる巨大な分子鎖（凝集複合体）が生じ、その量や大きさは、抗体濃度を一定とすると、抗原濃度に依存して増加するため、この分子鎖の量や大きさの変化を光学的な量の変化（例えば、散乱光強度または透過光強度の変化）として測定することにより、抗原濃度を定量的に捉えることができる。しかしながら、抗原過剰領域では、抗体に対して抗原が過剰に存在するために抗原抗体複合体の抗原と抗体の構成比率は約2:1となり、抗体の抗原結合部位が飽和され、抗原を介して架橋構造を形成しにくくなる。したがって、上記のような分子鎖が生じにくくなり、抗原抗体複合体の量や大きさの変化を光学的な量の変化としてとらえることができなくなるために、測定値が小さくなる。その結果、低濃度の場合と区別が付きにくくなる。故に、プロゾーン現象が発生すると、被検物質濃度の正確な測定ができないという問題があるうえに、偽陰性の問題も生じる。

【0006】

このような抗原過剰領域で生じるプロゾーン現象を緩和させるための反応系として、トリカルボン酸またはトリカルボン酸塩を含む酸性緩衝液を使用する方法が報告されている

(例えば、特許文献1)。一般的に、抗原抗体反応による測定は中性から弱アルカリ性側で行われることが多いが、上記特許文献では、弱酸性条件下で反応を行わせることによって、プロゾーン現象を抑制し、特に抗原過剰領域のより広い範囲で、より正確な定量測定を可能としている。

【特許文献1】特開2003-66047号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

上記のように、酸性緩衝液を使用する免疫反応測定法は、抗原過剰領域でのプロゾーン現象に起因する問題を解決するには優れている。しかし、一方で、抗原が低濃度の場合に、測定される散乱光強度が本来あるべき値よりも高くなる傾向が顕著であった。これは、抗原抗体反応に関らない反応、例えば、抗体分子どうしの非特異的な凝集物の形成などによるものと考えられる。免疫測定、特に免疫定量測定を行おうとする場合、このような現象が生じると、抗原抗体反応に関係のない非特異反応が含まれるために、正確に抗原抗体反応量を捉えることができず、低濃度側で高精度を求めるのは難しくなる。あるいは、このような非特異的な凝集物は経時的に際限なく大きくなるため、時間の経過とともに散乱光強度が上昇し得、したがって測定値が、検体をセッティングしてから測定までの時間が長いほど上昇する等の理由からも、測定精度の低下につながる。加えて、ここに示すような経時的な試薬特性のバラツキは、試薬の保存特性にも影響を及ぼす。また、測定の再現性の点においても、非特異凝集を再現性よく行わせることができるわけではないから、低濃度領域で再現性よく定量測定をおこなうには大きな阻害要素となる。さらには、同じ試薬作製ロットであっても、試薬使用ロット間差が顕著に表れて、その都度補正を必要とする。ここに示す問題は、特に、抗原が微量にしか存在しない場合（または、抗原抗体複合体が微量にしか存在しない場合）に無視できないものとなる。

【0008】

酸性緩衝液を使用する免疫反応測定で抗体分子の非特異凝集が起こる理由としては、測定溶液中で抗体分子上の電荷が中和され、抗体分子どうしの電気的反発がないことが考えられる。一般に、抗体のようなタンパク質分子を含む溶液のpHが抗体分子の等電点(pI)と同じである場合、抗体分子の正味電荷は溶液中でゼロになり、抗体分子同士の電気的反発力がなくなる。抗体の等電域は、一般的に約5から約8付近であるため、酸性緩衝液中では、溶液のpHが抗体分子の等電点に同じか極めて近い値になり、抗体分子どうしの電気的反発の欠如から、それらが互いに非特異的に凝集することになると考えられる。したがって、プロゾーン現象の抑制を目的として酸性緩衝液を使用する場合における、このような非特異的な凝集の問題を解決する方法が求められている。

【0009】

本発明は、このような状況に鑑みてなされた。すなわち、本発明は、抗体の等電域付近での抗原抗体反応に基づく被検物質の測定において、抗体分子どうしの非特異的な凝集を抑制して、抗原抗体複合体の測定感度・測定精度を増強することを目的とする。特に、本発明は、酸性溶液中での抗原抗体反応に基づく被検物質の測定において、抗原過剰領域でのプロゾーン現象を抑制し、かつ抗体分子の非特異的な凝集を抑制して、抗原抗体複合体の測定感度・測定精度を（特に抗原低濃度域で）増強する反応系を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明は、検体中の被検物質を抗原抗体反応原理に基づいて測定する方法を提供する。この方法は、被検物質に対する抗体を含む試薬と検体とを混合する工程、混合した結果生じる反応系において、上記被検物質と上記抗体との間で形成される抗原抗体複合体の量を測定する工程、および前記抗原抗体複合体の量を測定する工程において測定された前記抗原抗体複合体の量に基づいて前記被検物質の量を算出する工程を含み、ここで、上記抗体のpIと上記反応系のpHとの関係が、 $pI > pH$ となるように設定されている。

【0011】

本発明の方法の好ましい実施形態では、上記 pI と上記 pH との差は、約 0.5 以上である。さらに好ましくは、 pI と pH との差は、約 1.0 以上である。

【0012】

さらに好ましい実施形態では、上記反応系の pH は酸性に設定されている。より好ましくは、反応系の pH は、約 4～約 6 の範囲である。最も好ましくは、反応系の pH は約 4.5 である。

【0013】

さらに好ましい実施形態では、上記混合する工程は、緩衝液に試薬を添加する工程と、上記試薬を含む上記緩衝液と上記検体とを混合する工程とを含む。より好ましくは、上記緩衝液の pH が、抗体の pI に対して、 $pI > pH$ となるように調整されている。

【0014】

さらに好ましい実施形態において、上記反応系は、有機酸または有機酸塩を含有する。より好ましくは、有機酸または有機酸塩は、多価カルボン酸または多価カルボン酸塩である。さらにより好ましくは、上記多価カルボン酸または多価カルボン酸塩は、トリカルボン酸またはトリカルボン酸塩である。

【0015】

さらに好ましい実施形態では、上記抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、または標識抗体のいずれかである。

【0016】

さらに好ましい実施形態では、上記測定する工程は、上記複合体の量もしくは大きさの変化に起因する光学変化量を測定することを含む。

【0017】

別の局面において、本発明は、抗原抗体反応原理に基づいて検体中の被検物質を測定するための試験溶液を提供する。この試験溶液は、被検物質に対する抗体を含有し、当該抗体の pI に対して、 $pI > pH$ となるように pH が調整されている。この試験溶液を検体と混合して生じる反応系において、被検物質と抗体との間で形成された抗原抗体複合体の量が当該被検物質の量の指標である。

【0018】

本発明の試験溶液の好ましい実施形態では、 pI と pH との差が、約 0.5 以上である。さらに好ましくは、 pI と pH との差が、約 1.0 以上である。

【0019】

好ましくは、本発明の試験溶液は、酸性 pH を有する。より好ましくは、本発明の試験溶液の pH は約 4～約 6 の範囲にある。最も好ましくは、本発明の試験溶液の pH は約 4.5 である。

【0020】

さらに好ましくは、本発明の試験溶液は、有機酸または有機酸塩を含有する。より好ましくは、上記有機酸または有機酸塩は、多価カルボン酸または多価カルボン酸塩である。さらにより好ましくは、上記多価カルボン酸または多価カルボン酸塩は、トリカルボン酸またはトリカルボン酸塩である。

【0021】

さらに好ましくは、本発明の試験溶液に含まれる抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、または標識抗体のいずれかである。

【0022】

さらに別の局面において、本発明は、検体中の被検物質を抗原抗体反応原理に基づいて測定するためのキットを提供する。このキットは、少なくとも緩衝液と、被検物質に対する抗体を含む試薬とを含み、上記緩衝液の pH と上記抗体の pI とは、 $pH < pI$ の関係を有するように構成されている。

【0023】

本発明のキットにおいて、好ましくは、抗体の pI と緩衝液の pH との差は約 0.5 以

上である。さらに好ましくは、上記 p I と上記 p H との差は約 1.0 以上である。

【0024】

本発明のキットのさらに好ましい実施形態では、緩衝液の p H は酸性である。より好ましくは緩衝液の p H は約 4 ～ 約 6 の範囲にある。最も好ましくは、緩衝液の p H は約 4.5 である。

【0025】

さらに好ましい実施形態では、本発明のキットに含まれる緩衝液は、有機酸または有機酸塩を含む。より好ましくは、有機酸または有機酸塩は、多価カルボン酸または多価カルボン酸塩である。さらにより好ましくは、多価カルボン酸または多価カルボン酸塩は、トリカルボン酸またはトリカルボン酸塩である。

【0026】

さらに好ましい実施形態では、本発明のキットに使用される抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、または標識抗体である。さらに好ましくは、上記抗体は、異なるエピトープを認識する少なくとも 2 種類以上のモノクローナル抗体の混合物である。

【0027】

さらに好ましくは、本発明のキットに含まれる抗体試薬は、乾燥状態で提供される。

【0028】

さらに好ましくは、本発明のキットの緩衝液と抗体とは、被検物質の測定のために使用される直前に混合されて試験溶液として使用される。

【0029】

好ましい実施形態において、本発明のキットに使用される抗体は、物質がもつ電荷の差を利用する分析法または精製法により調製される。好ましくは、物質がもつ電荷の差を利用する分析法または精製法は、等電点沈降法、等電点電気泳動、イオン交換クロマトグラフィ法、または等電点クロマトグラフィ法のいずれかである。

【発明の効果】

【0030】

本発明は、検体中の被検物質を抗原抗体反応原理に基づいて測定する方法において、被検物質に対する抗体の有する p I と測定用反応溶液の p H との関係を $p I > p H$ となるように設定することにより、上記抗体の p I 値付近の p H を有する溶液中で上記測定を行った場合における抗体分子間の非特異的凝集の形成を抑制する。これにより、被検物質の量の測定において、測定感度および測定精度を改善することができる。

【0031】

さらに、上記のように被検物質に対する抗体の p I 値と反応溶液の p H 値との関係を設定した反応系において、反応系の p H を酸性、好ましくは p H 約 4 ～ 約 6、最も好ましくは p H 4.5 付近に設定することにより、抗原過剰領域でのプロゾーン現象（または、それに伴う測定値の減少）をも抑制し得る。

【0032】

抗体分子間の非特異的凝集を抑制する利点としては、以下のようなものがある。

【0033】

第一に、抗原抗体反応に関係のない非特異反応を除くことができるため、特に低濃度側で正確に抗原抗体反応量を捉えることができ高精度あるいは高感度測定が可能となる。さらに、再現性のない非特異反応を除くことで、特に低濃度領域で再現性よく定量測定を行うことができる。

第二に、抗体の非特異的凝集に起因する測定精度の低下、例えば、経時的に際限なく凝集していく非特異的凝集に由来する測定値への経時的影響（測定試薬をセッティングしてから測定するまでの時間の長さにより測定値が変化する）も、極力抑えることが可能となる。加えて、ここに示すような経時的な試薬特性のバラツキを抑えることで、試薬の保存特性を安定させることもできる。

【0034】

さらに、抗体の非特異的凝集が抑制されることにより、試薬ロット間の測定値の差を抑

制することができ、新しい試薬ロットに変更して測定する場合に、その都度補正をする必要を極力減少させることができる。

【0035】

さらに、本発明にかかる免疫反応測定方法により、従来、抗原または抗体の非特異的自己凝集を低減するために使用されたトゥイーン20、オクチルグルコシド、ラウリル硫酸ナトリウム（SDS）、スクロースモノラウレート、CHAPSなどの界面活性剤の使用を極力排除し得る。これらの界面活性剤は、非特異的自己凝集を低減するために使用されるが、その量が大きくなると、逆に抗原抗体反応の結合能を弱める問題があった。それ故、界面活性剤の量は厳密に設定されなければならなかった。しかし、本発明により、界面活性剤を使用せずに非特異的自己凝集を除くことができるため、界面活性剤によるタンパク質の変性等の悪影響を考慮する必要がない。

【発明を実施するための最良の形態】

【0036】

本発明の一実施形態にかかる、抗原抗体反応原理に基づいて検体中の被検物質を測定する方法は、上記被検物質に対する抗体を含む試薬と上記検体とを混合する工程、上記混合の結果生じる反応系において、上記被検物質と上記抗体との間で形成される抗原抗体複合体の量を測定する工程、および上記測定によって得られた結果を演算処理して被検物質の量を算出する工程を含み、ここで、上記抗体の pI と上記反応系の pH との関係が、 $pI > pH$ となるように設定されていることを特徴とする。

【0037】

本発明の別の一実施形態にかかる、抗原抗体反応原理に基づいて検体中の被検物質を測定するための試験溶液は、被検物質に対する抗体を含有し、当該抗体の pI に対して、 $pI > pH$ となるように上記試験溶液の pH が調整されていることを特徴とする。この試験溶液を検体と混合して生じる反応系において、被検物質と抗体との間で形成される抗原抗体複合体の量に基づいて、被検物質の量が決定される。

【0038】

本発明のさらに別の一実施形態にかかる、検体中の被検物質を抗原抗体反応原理に基づいて測定するためのキットは、緩衝液と、被検物質に対する抗体試薬とを含む。ここで、上記緩衝液の pH と上記抗体の pI とは、 $pH < pI$ の関係を有するように調製されていることが特徴である。被検物質の量は、被検物質と抗体との間で形成される抗原抗体複合体の量を測定することにより算出される。

【0039】

本発明の各実施形態において、反応系、試験溶液、および緩衝液の pH は、好ましくは酸性であり、より好ましくは $pH 4 \sim 6$ の範囲であり、最も好ましくは $pH 4.5$ に設定される。

【0040】

抗体のようなタンパク質の水溶液中での非特異的凝集を考える上で、重要な要素となるのは、そのタンパク質の pI （等電点）値とその水溶液の pH 値との関係である。タンパク質を構成しているアミノ酸側鎖やアミノ末端、カルボキシル末端の電荷は媒体の pH 条件によって変化するが、 pI （等電点）とは、そのタンパク質の電荷の総和がゼロになる媒体の pH 値のことをいう。したがって、抗体のようなタンパク質分子（複数）を含む反応溶液の pH が、そのタンパク質分子の等電点に等しい場合、タンパク質分子はその溶液中で無電荷となり、そのため分子どうしの電気的反発力が緩和され、非特異的な吸着による分子の凝集が生じる。また、均質な反応溶液中の抗体分子の等電点が一定の pH 領域（本明細書中、「等電域」と呼ぶ。）にわたって分布している場合、反応溶液の pH がその等電域の中間に位置するときは、無電荷状態の抗体分子だけでなく、低電荷状態の抗体分子も同じ溶液中に存在することになる。低電荷状態の抗体分子には、陽電荷と陰電荷をもつものが存在し、それらどうしで電荷が中和されるため、これも抗体分子の非特異的凝集を促進すると考えられる。

【0041】

一般的な抗体の等電点は、約 5.0 から約 8.0 の間にあるため、酸性緩衝液中での免疫反応測定では、測定反応溶液である酸性緩衝液の pH が、測定用抗体試薬の等電域に同じか、あるいは、測定用抗体試薬の等電域の中間に存在している場合が多い。このような場合、電荷の中和による抗体分子の非特異的凝集が起こりやすいと考えられ、それが測定感度、精度、経時特性、保存特性または再現性等の低下を生じさせると考えられる。

【0042】

上記のような抗体分子の非特異的凝集の問題を解消するには、抗体分子に電荷を持たせることによって、分子間反発を促し、溶液中で個々の分子として安定化させるようにすればよい。酸性緩衝液を基本とした反応系では、(抗体の pI 値) > (溶液の pH 値) となるように抗体分子および溶液の pH を選択すると、個々の抗体分子に陽性の電荷をもたせることができ、分子どうしの電気的反発力によって非特異的凝集を防ぐことができる。さらに、pI 値と pH 値の比較による抗体分子の電荷の大きさは、例えば、等電点電気泳動の pH タイトレーション分析で知ることができる。(図 1 を参照)。抗体分子間の電気的反発を促進するためには、抗体の pI 値と溶液の pH 値との差 ($|pI - pH|$) は大きければ大きいほど良く、 $|pI - pH|$ が、好ましくは少なくとも 0.5 以上、最も好ましくは 1.0 以上となるように設定する。

【0043】

本発明において、抗体分子の pI 値と溶液の pH 値との関係に基づいて反応系を設定するときは、抗体分子の標識化の影響、抗体周囲の環境の影響、等電域などを考慮することが重要である。なぜなら、一般に、抗体の等電点は約 5.0 から約 8.0 の間にあるが、抗体に標識を付けた場合や抗体の周囲の環境によっては、5.0 より小さくなったり、8.0 よりも大きくなったりすることもあり得るからである。即ち、等電点は、緩衝液のイオン強度、緩衝液組成の種類等によって影響されるものである。さらに、抗体を、例えば、金属コロイド、ラテックス粒子、もしくは色素化合物等で標識することによっても影響される。また、ポリクローナル抗体の場合、さらには、モノクローナル抗体であっても、個々の抗体分子は、それぞれわずかに異なる等電点を有するため、このような溶液では、溶解している抗体分子の等電点は、上記のように「等電域」という形で存在していることが通常である。

【0044】

本発明における免疫反応測定のための反応溶液は、酸性溶液を使用することが好ましい。反応溶液として酸性溶液を使用する利点は、被検物質の高濃度領域でのプロゾーン現象の緩和およびプロゾーン現象に伴う測定値の低下を抑制する効果が得られることである。酸性溶液の pH は、好ましくは pH 4 ~ 6、最も好ましくは pH 4.5 に設定される。

【0045】

本発明の免疫反応測定方法、試験溶液、および測定用反応キットに含まれる「被検物質に対する抗体」とは、抗原抗体反応原理に基づいて被検物質に対して特異的に結合する抗体のことをいう。それらの抗体は、例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、及び標識抗体等であり得る。モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞株により産生される。ハイブリドーマ細胞株は、抗体を産生する B 細胞と骨髄腫瘍細胞 (ミエローマ細胞) を細胞融合することにより得られた抗体産生能と強い増殖能を併せ持つ融合細胞集団より 1 つの細胞のみを分離し、増殖させて確立される。ポリクローナル抗体は、動物に抗原を投与し、血中に抗原を結合する抗体を多量に出現させ、この血液の全部または一部を採取し、精製することによって得られる。抗原抗体反応 (複合体形成) に伴う分子の大きさの変化量を、被検物質の量を測定するための指標として利用する均一系での免疫反応測定では、凝集複合体を形成しやすい抗体を使用することがより好ましい。ポリクローナル抗体は、様々なエピトープを認識する抗体の集合体であるために、容易に凝集複合体を形成するので、好ましい。モノクローナル抗体は、1 つのエピトープのみを認識し、1:1 の反応に基づく複合体が形成されるため、ポリクローナル抗体の場合と比べて、凝集複合体は形成しにくい。被検物質が、例えば、モノマー蛋白の 5 量体である C 反応性タンパク質のような多価抗原の場合には、十分に使用し得る。また、異なるエピトープを認識する

少なくとも2種類以上のモノクローナル抗体の混合物とすることにより、一種のポリクローナル抗体を人工的にデザインすることも可能である。

【0046】

さらに、標識物として、例えば、金属粒子、ラテックス粒子を用いて、標識抗体とすることでさらに凝集複合体の形成が促進され得る。ここで、金コロイド標識抗体の作製は、例えば、以下のようにして行うことができる。500ml三角フラスコに290nmの吸光度で0.86に調整された塩化金酸溶液（和光製）を200ml入れ、沸騰中に1%クエン酸ナトリウム（和光製）溶液4mlをすばやく加える。反応溶液は、青色からやがてワインレッド色に変化し、その変化を確認してからさらに15分間放置させる。室温に自然冷却後得られた金コロイド溶液をpH8.9とし、抗体、BSAを順次加え、抗体を標識させる。標識後は、未標識抗体とBSAを除去するために遠心分離を行う。こうして金コロイド標識抗体を作製する。

【0047】

本発明の免疫反応測定法、試験溶液、および測定用反応キットに用いられる抗体は、特に限定されず、抗原である被検物質に特異的に結合するものであれば、IgG、IgM、IgE、IgA、IgDのいずれのクラスの抗体であってもよい。この中で、IgG抗体が非特異的な反応が比較的少なく、また、市販されているものも比較的多く、入手も容易であるため好ましい（例えば、フナコシ、コスモバイオ等の供給業者により市販されているが、これらに限られない）。また、抗体の由来動物種に関しても、特に限定されないが、ウサギ、ヤギ、マウス由来の抗体が比較的入手も容易であり、使用例も多いため好ましい。

【0048】

本発明の免疫反応測定法、試験溶液、および測定用反応キットにおいて使用する所定のpIを有する抗体の選択方法として、種々の分析法、及び精製法が使用され得るが、好ましくは、物質がもつ電荷の差を利用するもの（例えば、等電点沈降法、等電点電気泳動、イオン交換クロマトグラフィ法、等電点クロマトグラフィ法）が使用され得、特に、等電点電気泳動、イオン交換クロマトグラフィが好ましい。

【0049】

等電点電気泳動を用いて所定のpI値を有する抗体を分析及び選択するには、例えば、以下のようにすればよい。図1を参照して説明する。等電点電気泳動用アガロースゲルを用いて、試料点着直前にアガロースゲルに電位差をかけpHグラジエントアガロースゲルを作製する（13）。その後、直ちに、試料を点着し、約1時間試料を泳動させる。試料が負電荷であれば陽極（12）に泳動し始め（14）、また、正電荷であれば陰極（11）に泳動し始める。いずれも、時間が経過し、pHグラジエントアガロースゲル上を泳動するに従い、ゲル上のpH値と試料のpI値との関係からの無電極になっていき、やがて泳動が止まる。等電域pI値はその位置であることを示し、その位置のゲルpH値がpI値となる。

【0050】

さらに、試料のタイトレーション分析も等電点電気泳動装置を用いて行える。図2（a）および図2（b）を参照して説明する。上記と同様に、まず、pHグラジエントアガロースゲルを作製する（15）（図2（a））。その後、作製したゲルを90度回転させて電気泳動装置にセットする（16）（図2（b））。そこに試料を点着して約1時間泳動させる。これにより、各pH条件における試料の電荷を知ることができる（17）。即ち、酸性側であれば、試料は正電荷を帯びるので陰極のほうへ、アルカリ性側では、試料は負電荷をもつので陽極のほうへ同時に泳動し始めるため、17に示すように、pH依存のタイトレーションカーブが得られるのである。これをみれば、どのpH領域で、正負いずれの電荷であり、それはどの程度の大きさなのか、定性的に分析することができる。

【0051】

これらの方法により、当業者は、過度の実験を要せずに、抗体のpIおよび反応溶液のpHが調整された本発明にかかる免疫反応測定用の反応系を構築することができる。

【0052】

本発明の免疫反応測定方法、試験溶液、および測定用反応試薬キットにおける被検物質は、特に限定されるものではなく、一般に抗原抗体反応を利用して測定できる物質であればよい。それらには、例えば、タンパク質、核酸、脂質、細菌、ウイルス、ハプテンなどが挙げられる。とりわけ、タンパク質は、臨床検査上の主たる測定対象であるため好ましい。そのようなタンパク質として、例えば、LH（黄体形成ホルモン）、FSH（卵巣刺激ホルモン）、hCG（絨毛性腺刺激ホルモン）などのホルモンや、各種免疫グロブリンクラスやサブクラス、補体成分、各種感染症マーカー、C反応性タンパク質、アルブミン、リウマチ因子、血液型抗原などが挙げられる。

【0053】

本発明の免疫反応測定に使用する反応溶液には、好ましくは有機酸または有機酸塩が含まれている。それらは、好ましくは、多価カルボン酸、または、多価カルボン酸塩である。多価カルボン酸とは、複数のカルボニル基をもつ有機酸のことで、本発明では、特に、トリカルボン酸またはトリカルボン酸塩であることが好ましい。トリカルボン酸またはトリカルボン酸塩の濃度は、任意であり得るが、プロゾーン現象緩和の効果および測定値の低下を抑制する効果を有意に奏するためには、0.3Mを超えないことが好ましい。より好ましくは、トリカルボン酸またはトリカルボン酸塩の濃度は、0.2Mを超えず、最も好ましくは、0.1Mを超えないように選択される。トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩の例として、クエン酸、イソクエン酸、アコニット酸、及び、これらの塩が挙げられる。これらは、例えば、無水クエン酸、クエン酸一水和物、クエン酸三ナトリウム、クエン酸三ナトリウム二水和物、クエン酸三カリウム一水和物、クエン酸三アンモニウム、クエン酸水素ニアンモニウム、クエン酸カルシウム四水和物、クエン酸マグネシウム九水和物、クエン酸三リチウム水和物、クエン酸銅（II）2.5水和物、DL-イソクエン酸三ナトリウム、trans-アコニット酸、cis-アコニット酸無水物などの形態で市販されており、これらを単独または組み合わせで使用することができる。とりわけ、クエン酸、クエン酸塩、アコニット酸、または、アコニット酸塩は、比較的安価で室温保存が可能で、安定性が高いものを入手することができ、また使い易いという観点から、好ましい。本発明において使用するこれらの有機酸または有機酸塩を含んだ反応溶液のpHは、好ましくは酸性であり、より好ましくは、pH4~6の範囲である。プロゾーン現象の緩和、あるいはプロゾーン現象に伴う測定値低下の抑制の効果を顕著にするためには、pH4.5付近であることが最も好ましい。pHが4より小さくなると、抗体の高次構造が水素結合の破壊等により破壊され、抗体の結合活性が低下または消失する可能性が高くなる。

【0054】

本発明の免疫反応測定において、抗原抗体複合体の量を測定する方法は、好ましくは、複合体形成による分子の量と大きさの変化に起因する光学変化量を測定するものである。特に、光学変化量が、光散乱強度または透過光量の変化量であることが好ましい。

【0055】

本発明の免疫反応測定法では、被検物質に対して特異的に結合する抗体を含み、かつpHが（好ましくは酸性に）調整された溶液は、測定を行う直前に調製されることが好ましい。測定用反応試薬キットの形態としては、測定用の抗体試薬を溶液中に含んだ状態で提供されてもよいが、保存安定性の観点から考えると、抗体試薬は凍結乾燥状態で提供され、使用直前にpHを（好ましくは酸性に）調整された溶液中に溶解して使用する形態が好ましい。

【実施例】

【0056】

以下に、ヒトアルブミンを被検物質としたときの実施例を用いて、本発明を説明するが、本発明はこれらの実施形態に限定されない。

【0057】

（実施例1）ヒトアルブミン測定用反応試薬キットの作製

【0058】

以下に示す緩衝液などの調製には、MILLI-Q SP TOC (Millipore社製) でろ過した純水を使用した。また、以下で特に記載の無い塩、緩衝剤などの試薬は和光純薬工業製の特級試薬を用いた。

【0059】

まず、抗体試薬を調製した。ウサギ抗ヒトアルブミンポリクローナル抗体は、ヒトアルブミンを免疫したウサギより採取した抗血清より、プロテインAカラム（アマシヤム・ファルマシア製）カラムクロマトグラフィを用いて精製した。精製は、1.5Mグリシン、3.0M NaCl、pH 8.9の結合緩衝液を用いて、プロテインAを平衡化した後に、抗血清をアプライし、抗血清中の抗体を特異的にプロテインAに吸着させることで、抗血清中の抗体以外の不純物を洗浄した。引き続き、0.1Mクエン酸、pH 4.0の溶出緩衝液を流し、抗体をプロテインAから溶出させ、回収した。溶出回収した抗体を分画分子量1万の透析チューブに入れ、0.05M 3-（N-モルホリノ）プロパンスルホン酸（同仁製、以下モプスと略する）0.15M NaCl 0.04重量% NaN₃、pH 7.4の組成の緩衝液（5L×2回）で透析を行い、緩衝液成分を置換した。透析後は、280nmの吸光度測定により抗体濃度を測定し、最終的に、透析で用いた緩衝液で3.0mg/mlに調製し、これを抗体溶液とした。

【0060】

次にトリカルボン酸または、トリカルボン酸塩を含む緩衝液の調製は次のようにして行った。トリカルボン酸は、クエン酸を用いた。最終濃度でクエン酸一水和物を0.05M ポリエチレングリコール6000を4重量%になるように計算し、調製目的体積の約90%の純水で溶解した。緩衝液のpHは4.0、4.5、5.0、5.5、6.0にNaOHを用いてそれぞれ調整した。

【0061】

（実施例2）ヒトアルブミンの免疫比ろう法による分析

【0062】

測定には、分光蛍光光度計（島津製作所製、型番RF-5300PC）を使用した。分光蛍光光度計の試料室に高温セルホルダー（島津製作所、型番06-15440）を配置し、恒温槽（TITEC製、商品名COOLNIT BATH EL-15）に接続し、温度25℃に保った水を循環して、測定時の温度を一定に保てるようにした。分光光度計の測定条件は励起、蛍光波長を共に670nmとし、蛍光側、励起側共にバンド幅3nmに、感度は高感度に設定した。

【0063】

測定は次のようにして行った。2.87mlの緩衝液と0.1mlの抗体溶液を攪拌混合した後に、これに0.03mlのヒトアルブミン溶液を加え攪拌混合した。これを蛍光分析用石英セルに移し、分光蛍光光度計に設置し、T型熱電対（RSコンポーネツより入手、型番219-4696）をセル内に浸漬し、ヒトアルブミンを混合後2分間経過した時点よりタイムコース測定で0.04秒間隔300秒測定した。測定中の温度はT型熱電対をデジタルマルチサーモメーター（アドバンテスト製、型番TR2114）に接続してモニタした。測定により得られた200から300秒の間の各測定値の平均値を求め、これを各濃度におけるヒトアルブミン溶液に対する測定値とした。

【0064】

結果を示す（図3、4）。図3は、横軸にヒトアルブミン濃度に対して縦軸に光散乱強度をプロットしたものである。反応溶液のpH（pH 4.0、4.5、5.0、5.5、および6.0）に依存して、プロゾーン現象が緩和され、そして測定値の減少が抑制されているのが観察される。測定値の減少の抑制効果は、特に、pH 4.5の反応系において最も顕著であった。しかしながら、pH 4.5の反応系では、ブランク値（HSA濃度が0のときの散乱光強度）が高いことも観察された（例えば、pH 6.0の反応系の結果と比較のこと）。これは今回使用したウサギ抗ヒトアルブミンポリクローナル抗体のおよその等電域が約4.5から7.0付近にあることによる。このことは、図1に示すように等電点電気泳動法（全自動等電点電気泳動装置：ファルマシア製）で確認している。即ち、

抗体の等電域と反応液のpHの差が小さいときは、抗体分子どうしの電气的反発力が弱まり、その結果、抗体分子間での非特異吸着が起こり、それが散乱光強度に寄与していると考えられた。

【0065】

図4は、横軸に抗体の等電域(pI)と緩衝液系のpHの差、即ち本実施例に用いた抗体の等電域で最も小さい値(pI=4.5)と反応溶液のpH(pH4.0、4.5、5.0、5.5、および6.0)の差に対して、縦軸に図3におけるブランク値をとったものである。図4に示されるように、抗体のpIと緩衝液系のpHの差が大きくなるほどブランク値が抑制されていることがわかる。

【0066】

(実施例3) 選択された抗体を用いてのヒトアルブミンの免疫比ろう法による分析

【0067】

上記の結果から、免疫比ろう法のような免疫反応測定法において、プロゾーン現象の緩和と測定値の低下防止という効果を維持しつつ、さらにブランク値を抑えるためには、酸性緩衝液のpHに対してできるだけ離れたpH領域に等電域を有する抗体を試験試薬として使用すればよいであろうと考えられた。図4の結果を鑑みるに、測定溶液のpHから少なくとも1以上離れた領域に等電域を持つ抗体を選択することが最も望ましいと考えられた。

【0068】

そこで、pI値5.5~7.4の範囲の等電域を有する抗体のみを含んだ抗体試薬を用いて、実施例2と同様の実験を行った。このような抗体を選択するには、前述の等電点電気泳動法を利用した(図1を参照のこと)。結果を図5に示す。図5は、等電域がpH5.5~7.4にある抗体試薬Bを用いて、pH4.5の反応溶液中で図3と同様の実験を行った結果と、図3で使用した抗体試薬Aを用いて同様の実験を行った結果との比較を示す。反応系に加えたHSA濃度が0の時、等電域pIが5.5~7.4の抗体試薬Bについての散乱強度(ブランク値)が、図3で使用した抗体試薬Aについての散乱強度よりも顕著に減少していることがわかる。

【0069】

このように、使用する緩衝液のpHに対して適切な等電域を有する抗体を選択して用いることにより、免疫反応測定法におけるブランク値の上昇を抑制することができた。

【産業上の利用可能性】

【0070】

本発明にかかる免疫反応測定方法及びそれに用いる試験溶液、測定用反応キットは、プロゾーン現象を抑制し、測定値の減少を抑制し、かつ抗体分子間の非特異的凝集を抑制するという効果を有するため、特に、免疫比ろう法、免疫比濁法、スライド凝集法などのような均一系の測定系を用いる免疫反応測定方法、及びそれに用いる試験溶液または測定用反応キット等として有用である。

【図面の簡単な説明】

【0071】

【図1】本発明において使用する抗体を選択するために使用する、抗体の等電点電気泳動法の概略図

【図2】本発明において使用する抗体を選択するために使用する、電気泳動的pHタイトレーション分析の概略図

【図3】本発明における酸性緩衝液を基本とした免疫比ろう法によるヒトアルブミンの測定結果を示す図。各pHにおける酸性緩衝液の抗原抗体反応に与える効果を示すとともに、抗体溶液であるウサギ抗ヒトアルブミンポリクローナル抗体の等電域によるブランク値へ及ぼす影響を示す。

【図4】反応溶液のpHとウサギ抗ヒトアルブミンポリクローナル抗体の等電域pI値の差がブランク値に及ぼす影響を示す図。図3の結果を酸性緩衝液のpH値とウサギ抗ヒトアルブミンポリクローナル抗体の等電域pI値の差に対するブランク値とし

て示す。

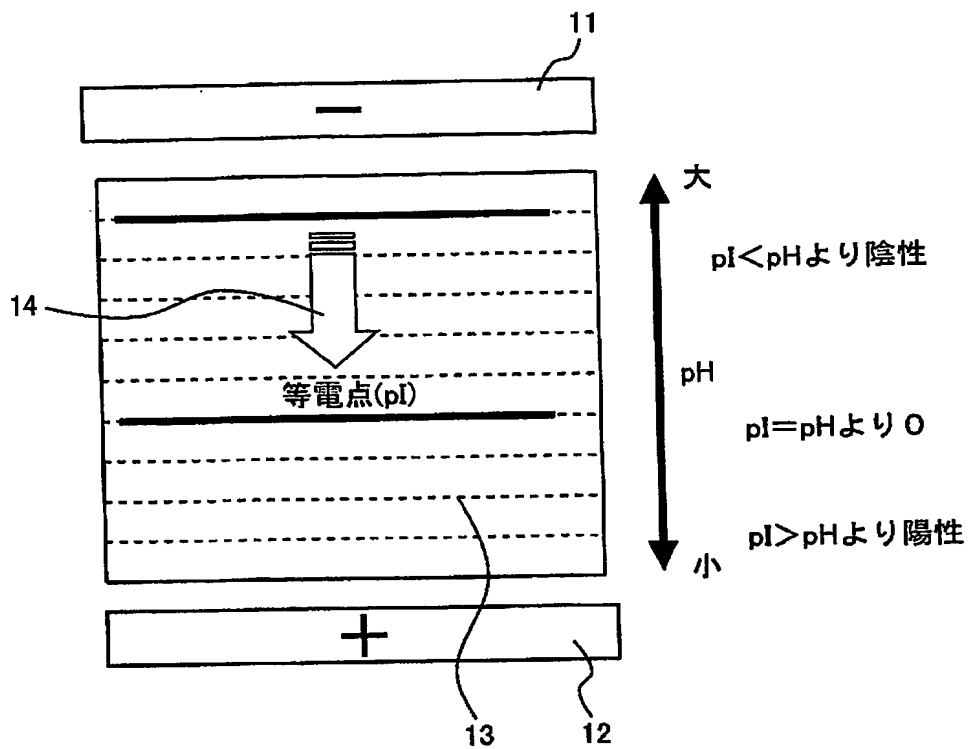
【図 5】本発明における酸性緩衝液 pH 4.5 を基本とした免疫比濁法によるヒトアルブミンの測定結果を示す図。適切な等電域をもつウサギ抗ヒトアルブミンポリクローナル抗体を用いて測定を行うことにより、抗体の非特異的凝集を抑制し得ることを示す。

【符号の説明】

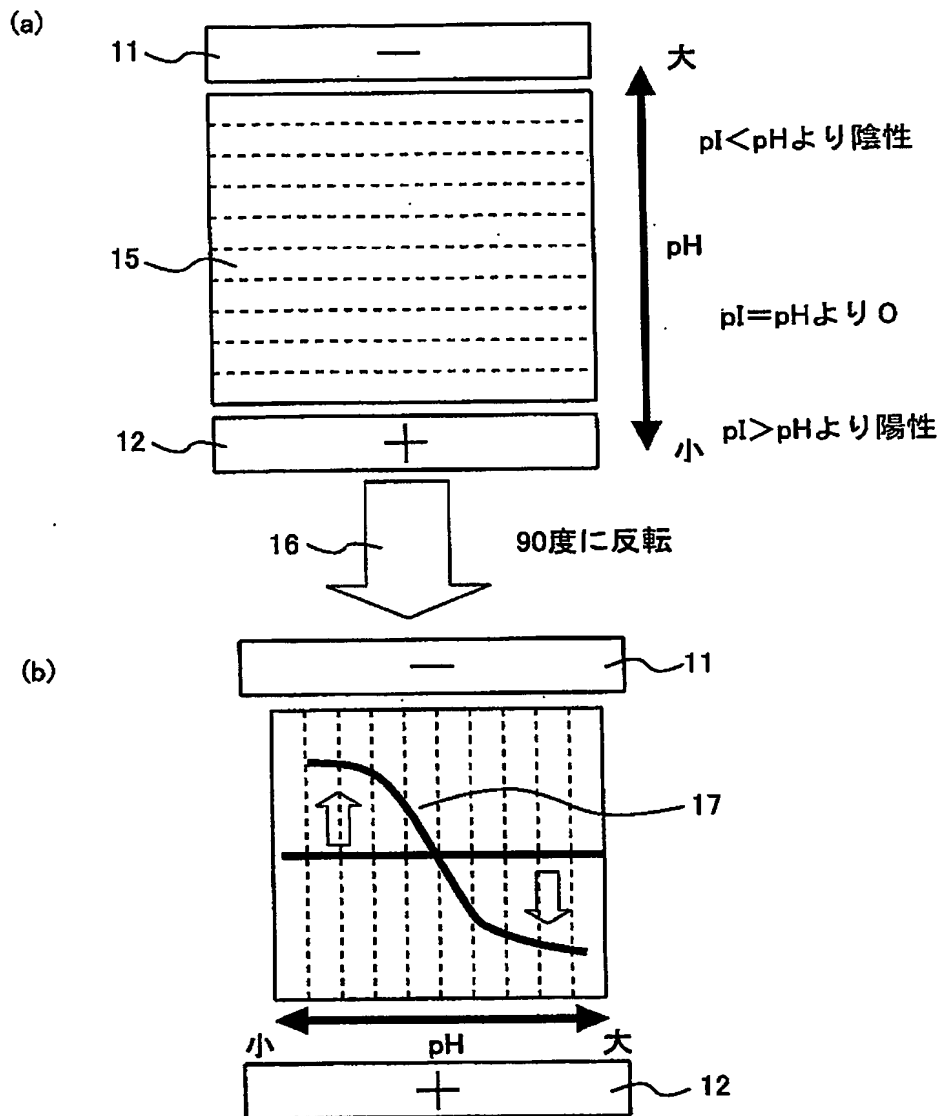
【0072】

- 11：電気泳動装置の陰極
- 12：電気泳動装置の陽極
- 13：等電点電気泳動用 pH 3-1.0 グラジエントアガロースゲル
- 14：試料点着後は試料が負電荷で陽極に泳動し始め、pH グラジエントアガロースゲル上を酸性領域へ泳動するに従い、無電極になっていき、やがて泳動が止まり、その位置が等電域であることを示す。
- 15：試料点着直前にアガロースゲルに電位差をかけ pH グラジエントアガロースゲルを作製することを示す。
- 16：15 で作製された pH グラジエントアガロースゲルを 90 度に回転させて試料を点着等電点電気泳動を行うことを示す図
- 17：pH タイトレーションカーブ

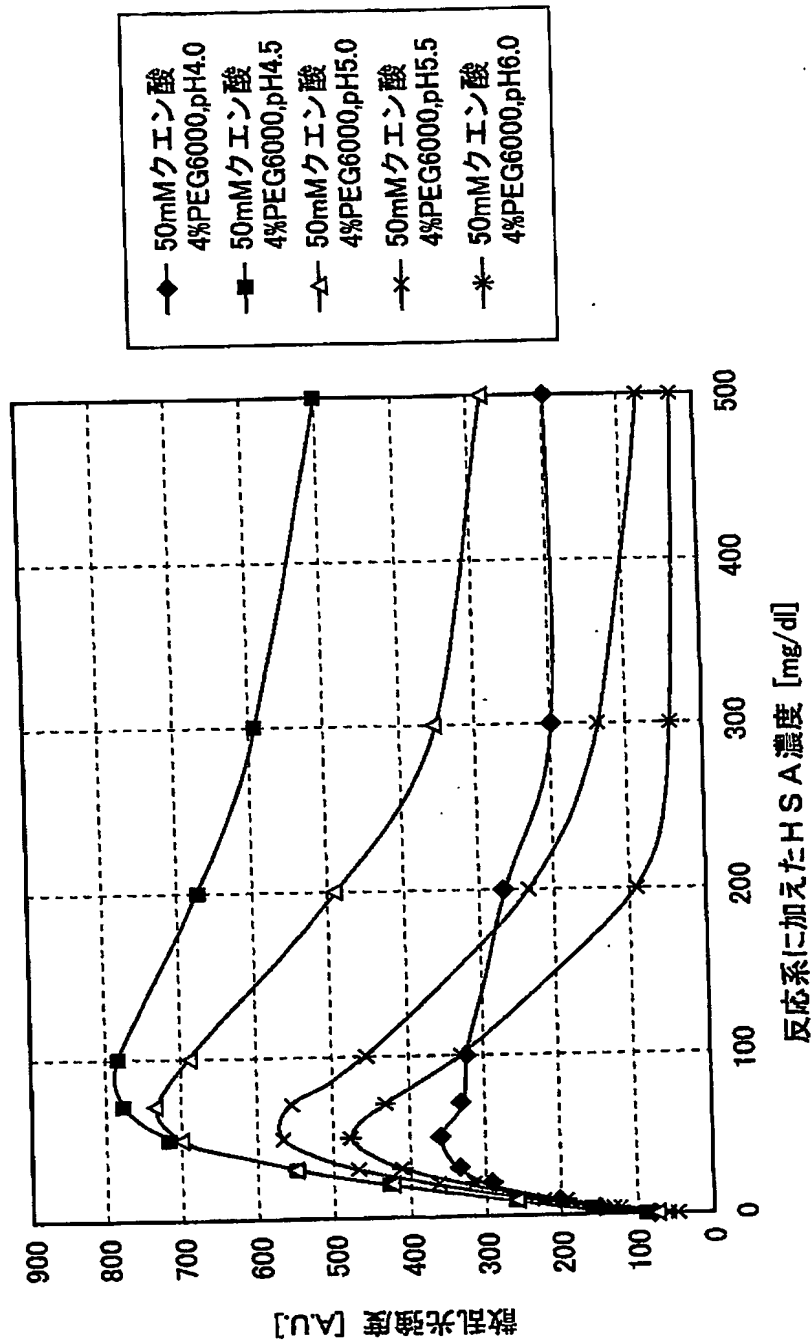
【書類名】 図面
【図 1】.



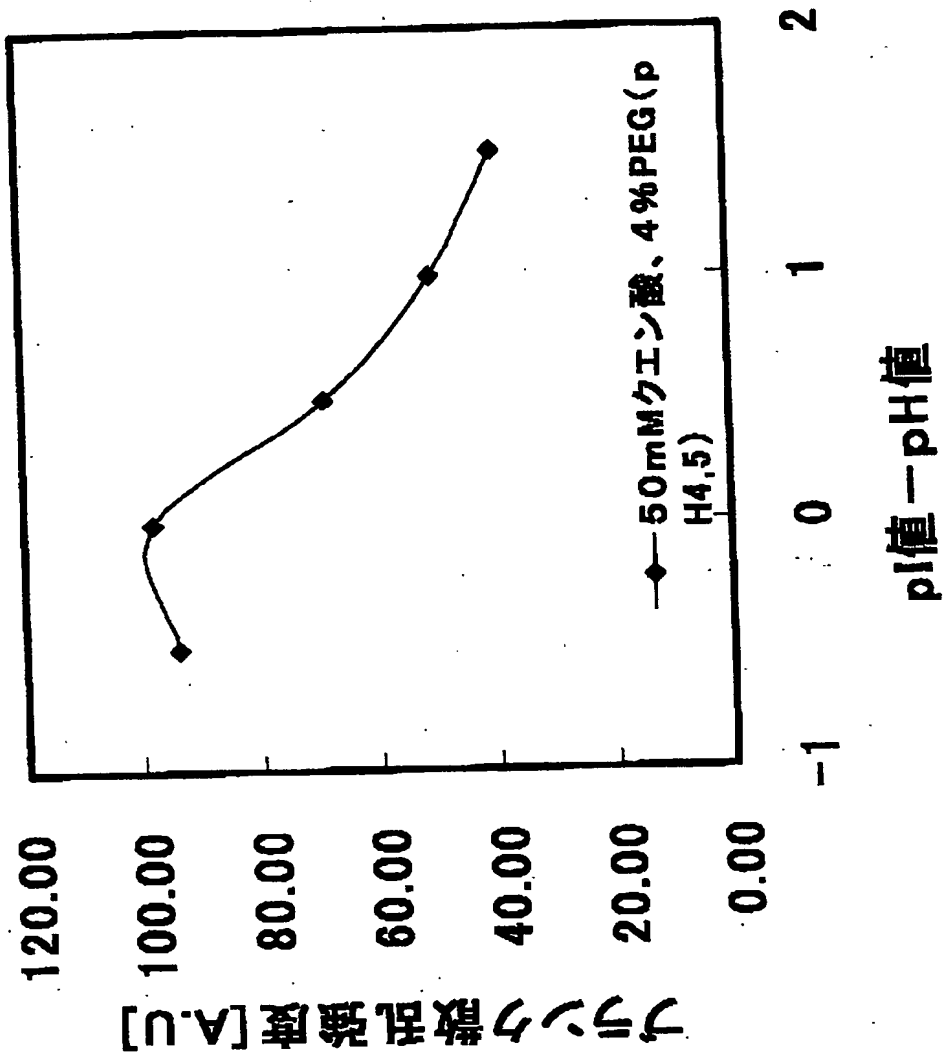
【図 2】



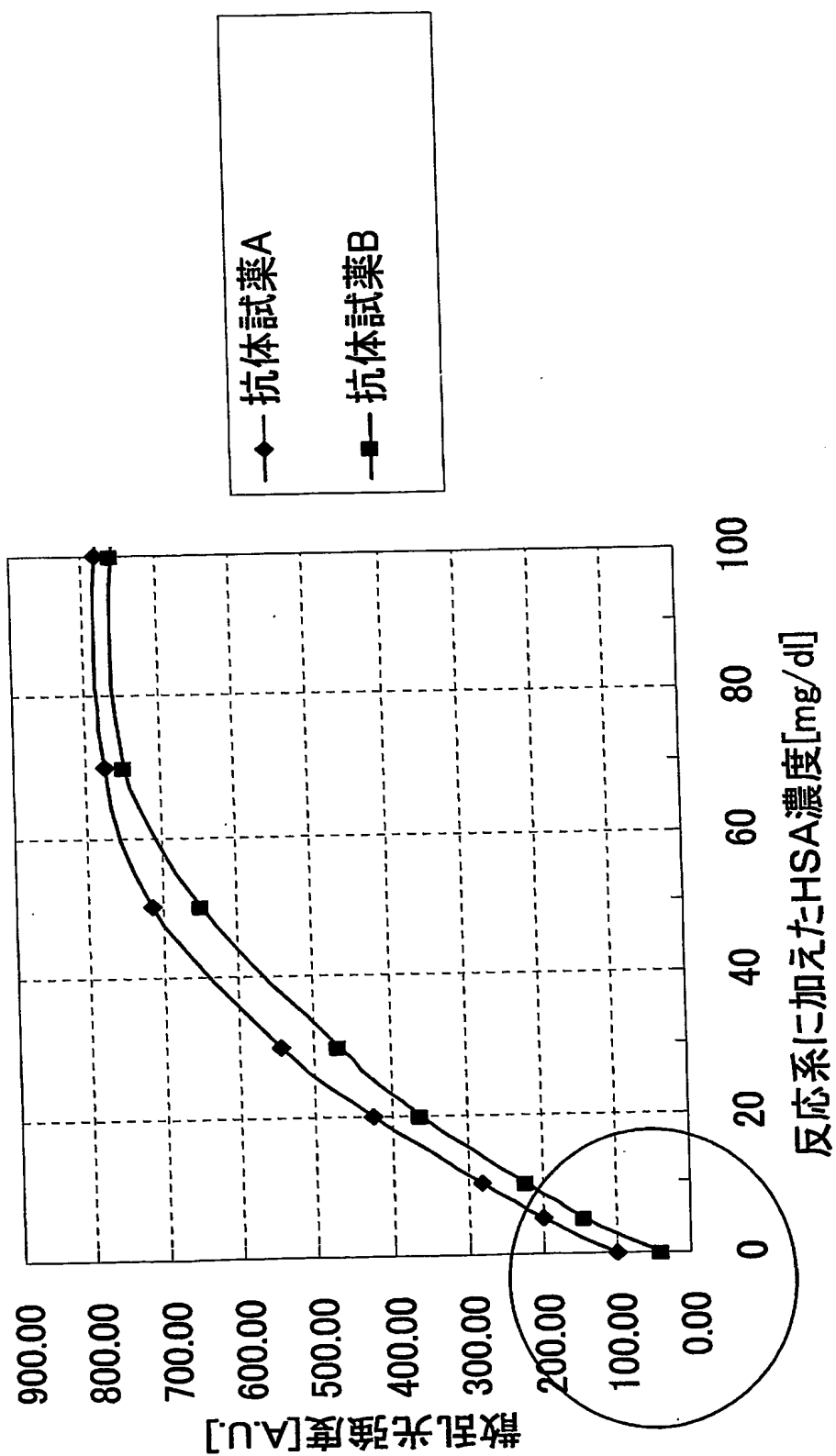
【図 3】



【図 4】



【図5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 酸性緩衝液を基本とした免疫測定反応系において、高濃度領域でのプロゾーン現象に代表される課題には優位な効果を示すが、低濃度側での反応においては、不必要に測定値が高くなる傾向があった点を改善すること。

【解決手段】 検体中の被検物質を抗原抗体反応原理に基づいて測定する方法であって、前記被検物質に特異的に結合する抗体と前記検体とを混合する工程、前記混合の結果生じる反応系において、前記被検物質と前記抗体との結合により生じる抗原抗体複合体の量を測定する工程、および

前記抗原抗体複合体の量を測定する工程において測定された前記抗原抗体複合体の量に基づいて前記被検物質の量を算出する工程を含み、

ここで、前記抗体の pI 値と前記反応系の pH 値との関係が、 pI 値 $>$ pH 値となるように設定されている、測定方法。

【選択図】 図 5

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-336199
受付番号	50301597029
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0090
作成日	平成15年 9月29日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成15年 9月26日

特願 2 0 0 3 - 3 3 6 1 9 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 5 8 2 1]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 8 日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地

氏 名

松下電器産業株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.